

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

DETEKSI *Vibrio parahaemolyticus* MENGGUNAKAN MARKA GEN *PirA* PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) DENGAN REAL TIME PCR

Ronald Kriston Sauttua Nainggolan^{*)}, Munti Yuhana^{**)}, Sukenda^{**)}, dan Woro Nur Endang Sariati^{*)}

^{*)} Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan
Jalan Raya Setu No. 1, Setu Cipayung, RT. 3/RW. 3, Setu, Jakarta Timur 13880

^{**)} Institut Pertanian Bogor

Kampus IPB Dramaga, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Dramaga, Babakan, Kec. Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680

(Naskah diterima: 26 Februari 2019; Revisi final: 8 Agustus 2019; Disetujui publikasi: 8 Agustus 2019)

ABSTRAK

Pengujian validitas deteksi *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan metode *real time* PCR dilakukan melalui tahapan pengujian yang mencakup spesifisitas, sensitivitas, repeatabilitas, reproduktivitas, dan uji lapang pada tambak-tambak udang vaname di Indonesia. Uji performa analitik menunjukkan bahwa metode *real time* PCR dengan penciri gen *VpPirA* spesifik dalam mendeteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND dan memiliki sensitivitas hingga 10 kopi μL^{-1} . Nilai *cut off* metode qPCR primer *VpPirA* adalah di Ct 39. Metode *real time* PCR dengan primer spesifik *VpPirA* juga memiliki nilai repeatabilitas dan reproduktivitas yang baik dalam mendeteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND. Semua pengujian performa analitik metode qPCR telah memenuhi syarat keberterimaan dan dapat digunakan sebagai metode pengujian untuk mendeteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND. Hasil uji lapang untuk seluruh sampel yang berasal dari tambak udang vaname menunjukkan hasil negatif terinfeksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND. Studi ini menyarankan bahwa metode *real time* PCR efektif dan valid dalam mendeteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND.

KATA KUNCI: *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND; *Litopenaeus vannamei*; *real time* PCR; deteksi

ABSTRACT: *Detection of Vibrio parahaemolyticus using PirA gen mark in whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei with real-time PCR. By: Ronald Kriston Sauttua Nainggolan, Munti Yuhana, Sukenda, and Woro Nur Endang Sariati*

Testing the validity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (*Vp* AHPND) strain detection in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by *real-time* PCR method was carried out through several stages including specificity, sensitivity, repeatability, reproducibility, and sampling field tests in shrimp ponds in Indonesia. Analytical performance test showed that the use of *real-time* PCR method with *VpPirA* primer was effective in detecting *Vp* AHPND strain and had a sensitivity of up to 10 copies μL^{-1} . The cut off value qPCR method of the primer *VpPirA* is at Ct 39. The *real-time* PCR method using *VpPirA* primer also has good repeatability and reproducibility values in detecting *Vp* AHPND strain. All analytical performance testings of the qPCR method meet the standard requirements to detect *Vp* AHPND strain. The result of field tests for all whiteleg shrimp samples from the shrimp ponds revealed negative infection of *Vp* AHPND. This study suggests that the *real time* PCR is effective and valid in detecting *V. parahaemolyticus* AHPND strain.

KEYWORDS: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain; *Litopenaeus vannamei*; *real-time* PCR; detection

PENDAHULUAN

Udang adalah produk perikanan andalan Indonesia yang menjadi komoditas ekspor, salah satu jenis yang paling dominan untuk diekspor adalah udang vaname.

Pada tahun 2009 di Negara Cina, budidaya udang vaname (*L. vannamei*) menghadapi kendala dengan munculnya kasus kematian dini yang menyerang udang sekitar hari ke-30 setelah penebaran pada kolam pemeliharaan yang ditandai dengan kerusakan pada hepatopankreas (nekrosis hepatopankreatik akut). Awalnya penyakit ini disebut sindrom kematian dini (EMS/early mortality syndrome), tetapi setelah ditemukannya *Vibrio parahaemolyticus* strain unik penyebab dari penyakit ini, nama penyakit dirubah

Korespondensi: Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. Jalan Raya Setu No. 1, Setu Cipayung, RT. 3/RW. 3, Setu, Jakarta Timur 13880, Indonesia
Tel. + 62 813 41970042
E-mail: rhomes2011@yahoo.com

menjadi nekrosis hepatopankreatik akut atau disebut dengan *acute hepatopancreatic necrosis disease* (AHPND) (Sirikharin *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). Oleh karena itu, spesies *Vibrio* spp. penyebab penyakit AHPND pada udang vaname disebut *V. parahaemolyticus strain* AHPND. *V. parahaemolyticus strain* AHPND pada udang vaname memiliki kelompok gen *tdh* dan *trh* yang dapat menghasilkan toksin Pir A/B penyebab kerusakan pada hepatopankreas dan mengakibatkan kematian pada udang.

Real time PCR adalah sebuah metode yang mengikuti konsep PCR konvensional namun dapat melakukan pengukuran produk PCR secara langsung saat proses terjadi. Metode ini biasa digunakan untuk deteksi patogen baik dalam penelitian atau proses mendiagnosis. *Real time* PCR menggabungkan bahan-bahan kimia PCR dengan *fluorescent probe* atau pewarna DNA seperti *sybr green*, sehingga memungkinkan visualisasi produk yang dapat dilihat secara langsung (*real time*). Metode *real time* PCR memberikan tingkat sensitivitas dan spesifisitas tinggi, dan kemudahan dan kecepatan dalam proses perancangan dan penyiapan qPCR menjadikannya sebagai metode uji kuantitatif yang efisien dan efektif. Amplifikasi qPCR dilakukan dalam kondisi tertutup sehingga mengurangi kemungkinan kontaminasi (Walters, 2012). Pada awal penggunaan metode biomolekular untuk mendeteksi AHPND hanya dengan PCR konvensional yaitu dengan primer AP1 dan AP2 (Flegel & Lo, 2013) dan kemudian primer AP3 (Sirikharin *et al.*, 2014). Han *et al.* (2015) membuat terobosan mendesain primer VpPirA *real time* PCR untuk mendeteksi AHPND dan membandingkannya dengan primer AP3 *single step* pada PCR konvensional, yang hasilnya primer VpPirA *real time* PCR lebih sensitif, spesifik, dan efisien daripada primer AP3 *single step* PCR konvensional. Dangtip *et al.* (2015) mendesain primer baru AP4 *nested* PCR konvensional untuk mendeteksi AHPND yang lebih baik dari primer AP3 *single step*. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk menguji validitas primer VpPirA *real time* PCR.

BAHAN DAN METODE

Bahan Uji

Genom DNA *V. parahaemolyticus strain* AHPND yang digunakan merupakan hasil ekstraksi dari *reference material* sampel uji profisiensi *Australian Animal Health Laboratory* berupa fiksatif jaringan yang di-spike bakteri *V. parahaemolyticus strain* AHPND. Proses ekstraksi DNA untuk pengujian dilakukan sesuai protokol *Qiagen Dneasy Blood and Tissue Kit Extraction* (Qiagen, Singapura). Pengujian spesifisitas menggunakan *V. parahaemolyticus non* AHPND ATCC (*American Type*

Culture Collection) 17802, *V. alginolyticus* ATCC 33782, *V. harveyi* ATCC 43515, dan *Vibrio vulnificus* ATCC 27562. Uji spesifisitas juga menggunakan beberapa patogen pada udang vaname, yaitu *white spot syndrome virus* (WSSV), *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHHNV), *infectious myonecrosis virus* (IMNV), *enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), dan *Sacbrood virus* (SBV).

Deteksi *V. parahaemolyticus* dengan PCR Konvensional

Deteksi *V. parahaemolyticus* menggunakan PCR konvensional dengan primer AP4 yang terdiri atas dua tahapan (Dangtip *et al.*, 2015), yaitu tahap pertama dengan formulasi bahan amplifikasi menggunakan *Go taq green™ Master Mix* 12,5 μ L; primer AP4-F1 (52 -ATGAGTAACA A T A TAAAACATGAAAC-32); dan primer AP4-R1 (52 -ATGAGTAACAA T A T A A AACATGAAAC-32) masing-masing sebanyak 1 μ L, DNA template 3 μ L, dan *nuclease-free water* (NFW) hingga volume total reaksi 25 μ L. Profil termal amplifikasi menggunakan suhu denaturasi awal 94°C selama dua menit, kemudian diikuti dengan 30 siklus yang terdiri atas suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, dan *elongasi* 72°C selama 90 detik.

Formulasi PCR konvensional AP4 tahap dua adalah dengan mereaksikan *Go taq green™ Master Mix* sebanyak 12,5 μ L; primer AP4-F2 (52 -TTGAGAATACGG GACGTGGG-32) dan primer AP4-R2 (52 -GTTAGTCATGTGAGCACCTTC-32) masing-masing sebanyak 1 μ L, DNA template (yang merupakan ampikon tahap pertama) sebanyak 3 μ L, dan NFW hingga volume total reaksi 25 μ L. Profil termal amplifikasi tahap kedua adalah menggunakan suhu denaturasi awal 94°C selama dua menit, kemudian diikuti dengan 30 siklus yang terdiri atas suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, dan *elongasi* 72°C selama 90 detik.

Deteksi *V. parahaemolyticus* dengan *Real Time* PCR

Formulasi bahan amplifikasi *real time* PCR untuk volume total 25 μ L (Han *et al.*, 2015) adalah *Qiagen master mix DNA probe* 12,5 μ L; primer VpPirA-F (52 -TTGGACTGTGAACCAACG-32) dan VpPirA-R (52 -GCACCCATTGGTAT TGAATG-32) masing-masing dengan volume 0,5 μ L; VpPirA probe (52 -6FAM-AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGA-TAMRA-32) 0,5 μ L; DNA template 2 μ L, dan NFW. Profil termal amplifikasi adalah 20 detik inkubasi pada suhu 95°C diikuti dengan 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 95°C selama tiga detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *elongasi* 72°C selama 60 detik.

Spesifisitas Analitik

Spesifitas analitik dilakukan pada contoh uji jaringan udang vaname yang negatif gen penyandi toksin *PirA*, beberapa spesies bakteri seperti *Vibrio parahaemolyticus* non AHPND, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, WSSV, IHNV, IMNV, EHP, dan SBV. Spesifisitas analitik juga dinilai dengan mendeteksi plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND sebanyak 100 μL yang telah di-spike dengan 0,02 g spesimen hepatopankreas dan saluran pencernaan udang vaname.

Sensitivitas Analitik

Sensitivitas analitik dilakukan dengan menguji lima seri pengenceran plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND, yaitu 10^1 kopi μL^{-1} sampai dengan 10^5 kopi μL^{-1} . Setiap pengenceran dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, dan pengujian dilakukan dengan metode qPCR dan PCR konvensional. Hasil pengujian LoD dan kurva standar digunakan sebagai acuan dalam menentukan nilai *cut off* (Caraguel *et al.*, 2011).

Keterulangan (Repeatability) dan Ketertiruan (Reproducibility)

Penentuan variabilitas repeatabilitas dilakukan dengan cara, tiga konsentrasi plasmid DNA mengandung gen penyandi toksin *PirA* (10^6 kopi μL^{-1} ; 10^4 kopi μL^{-1} ; dan 10^3 kopi μL^{-1}) diuji *duplicate* menggunakan PCR konvensional dan qPCR dalam waktu yang bersamaan (*intra assay*). Pengujian reproduktibilitas dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi plasmid DNA yang mengandung gen penyandi toksin *PirA* (10^6 kopi μL^{-1} ; 10^4 kopi μL^{-1} ; dan 10^3 kopi μL^{-1}) diuji oleh enam analisis berbeda menggunakan PCR konvensional dan qPCR dalam perbedaan jangka waktu dua hari (*inter assay*).

Uji Lapang

Evaluasi performa dan realibilitas metode pengujian terhadap spesimen klinis, sebanyak 69 sampel udang diambil dari sentral tambak udang vaname di Provinsi Jawa Barat (14 sampel), Lampung (19 sampel), Sumatera Utara (lima sampel), Nusa Tenggara Barat (lima sampel), Sulawesi Selatan (12 sampel), Pekan Baru (lima sampel), Jawa Timur (empat sampel), uji profisiensi AAHL (tiga sampel), dan uji profisiensi Arizona (dua sampel). Data hasil pengujian qPCR dimasukkan ke dalam perhitungan *diagnostic specificity* (DSp) dan *diagnostic sensitivity* (DSe) sesuai pada Tabel 1.

Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data deskriptif dengan melihat persentase koefisien varians (CV%).

HASIL DAN BAHASAN

Pembuatan Kontrol Positif dan Kurva Standar

Pengujian validitas dalam mendeteksi gen penyandi toksin *PirA* dengan menggunakan metode *real time* PCR diawali dengan pembuatan kontrol positif berupa plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND. Kontrol positif berupa plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND mempunyai konsentrasi $33,5 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm \text{STD } 0,7616$ (Tabel 2), kemudian konsentrasi plasmid DNA dikonversi ke dalam jumlah kopi yang akan digunakan sebagai kontrol positif adalah 6×10^9 kopi μL^{-1} . Tujuan pembuatan plasmid DNA adalah untuk membuat konsentrasi DNA menjadi stabil, sesuai dengan Banu & Prasad (2017) yang menyatakan bahwa fragmen DNA yang disisipkan ke dalam plasmid dengan kompatibilitas antar keduanya akan menyebabkan kestabilan terhadap plasmid DNA yang terbentuk. Kontrol positif digunakan dalam membuat kurva standar untuk kuantifikasi pengujian qPCR *primer VpPirA* dan sebagai acuan dalam melakukan tahapan-tahapan pengujian performa analitikal.

Linearitas dan efisiensi reaksi qPCR berdasarkan kurva standar pada pengenceran plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND menunjukkan hubungan linear lima logaritma pengenceran dari 6×10^5 kopi μL^{-1} sampai dengan 6×10^1 kopi μL^{-1} . Persamaan kurva standar deteksi gen penyandi toksin *PirA* metode qPCR adalah $Ct = -3.472 \cdot \log(\text{konsentrasi}) + 42.714$, nilai efisiensi amplifikasi (E) sebesar 0,9409; dan nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,99857. Hasil pembentukan kurva standar metode qPCR *primer VpPirA* sesuai dengan Bustin *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa efisiensi pengujian qPCR ditentukan dari kemiringan kurva regresi linear dengan nilai maksimum satu atau setara dengan 100%, dan Scholtens *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa nilai kemiringan antar Ct pada metode qPCR *primer PirA* adalah -3,472; menunjukkan tingkat efisiensi tinggi yang sesuai dengan kriteria kemiringan Ct yang berkisar antara -3,1 sampai -3,6. Pembuatan kurva standar metode qPCR dibutuhkan untuk memperkirakan konsentrasi sampel yang diuji sehingga dapat digunakan untuk menentukan tingkat infeksi suatu patogen (Muniesa *et al.*, 2014).

Spesifisitas Analitikal

Pengujian performa analitikal dimulai dengan penilaian spesifisitas metode qPCR mendeteksi gen penyandi toksin *PirA*. Hasil uji spesifisitas qPCR *primer PirA* terhadap spesimen jaringan udang vaname sehat adalah 100% negatif (Gambar 1) dan hasil 100% positif terhadap udang yang di-spike dengan plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND (Gambar 2),

Tabel 1. Perhitungan estimasi *diagnostic sensitivity* (DSe) dan *diagnostic specificity* (DSp) dari hasil contoh uji udang vaname

Table 1. Estimation of *diagnostic-test sensitivity* (Dse) and *specificity* (DSp) of whiteleg shrimp test samples

		Jumlah contoh uji referensi yang dibutuhkan Number of reference test samples needed	
		Positif Positive	Diketahui negatif Known negative
Hasil pengujian Test result	Positif (Positive)	Benar positif True positive (TP)	Tidak benar positif False positive (FP)
	Negatif (Negative)	Tidak benar negatif False negative (FN)	Benar negatif True negative (TN)
		Sensitivitas diagnostik Diagnostic sensitivity (DSe)	Spesifisitas diagnostik Diagnostic specificity (DSp)
		$TP/(TP + FN)$	$TN/(TN + FP)$

menunjukkan bahwa metode qPCR *primer VpPirA* bersifat selektif karena tidak bereaksi terhadap matriks sampel berupa DNA atau RNA udang. Sesuai dengan OIE (2018) yang menyatakan suatu metode dikatakan selektif apabila secara akurat dapat mendeteksi target dalam kehadiran komponen matriks (inang) dan penghambat reaksi (reagen).

Deteksi gen penyandi toksin *VpPirA* dengan metode qPCR dan PCR konvensional pada beberapa spesies *Vibrio* spp. dan penyakit udang vaname lainnya memperoleh hasil negatif (Gambar 3), menunjukkan bahwa metode qPCR *primer VpPirA* tidak bereaksi silang (*cross reactive*) terhadap berbagai spesies *Vibrio* spp. dan penyakit udang vaname lainnya, sehingga bersifat spesifik. Sesuai dengan OIE (2018) yang menyatakan bahwa suatu metode dikatakan eksklusif apabila dapat mendeteksi analit atau sekuen genomik organisme target, dan tidak bereaksi silang terhadap

analit atau sekuen organisme non-target (seperti patogen lain yang berada pada inang yang sama). Hasil penilaian spesifisitas metode qPCR mendeteksi gen penyandi toksin *VpPirA* telah memenuhi syarat keberterimaan sebagai suatu metode uji, sehingga dilakukan penilaian performa analitik berikutnya berupa sensitivitas.

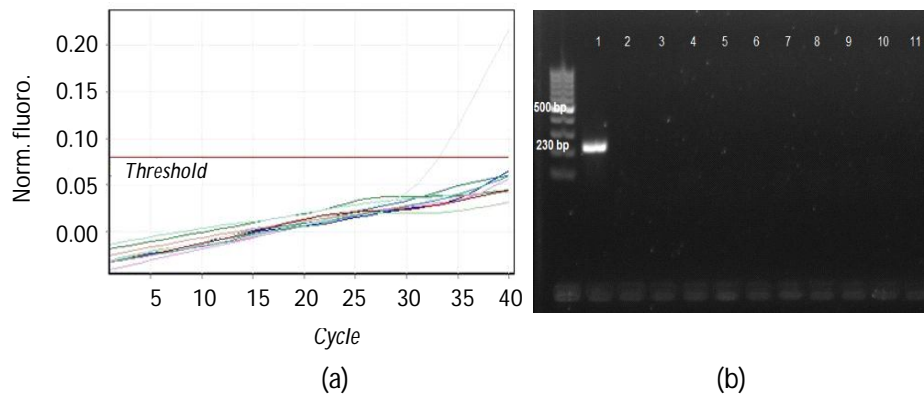
Sensitivitas Analitikal

Performa sensitivitas analitik metode qPCR *primer VpPirA* dinilai berdasarkan penentuan limit deteksi (*limit of detection*, LoD), yaitu konsentrasi plasmid DNA terendah yang dapat dideteksi oleh qPCR (Shrivastava & Gupta, 2015). Hasil LoD metode qPCR adalah 6×10^1 kopi μL^{-1} dan dengan metode PCR konvensional adalah 6×10^2 kopi μL^{-1} (Gambar 4). Hasil LoD menunjukkan bahwa qPCR dengan *primer VpPirA* mampu mendeteksi konsentrasi DNA yang lebih

Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi kontrol positif berupa plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND menggunakan GeneQuant®

Table 2. Results of measurement of positive control concentrations in the form of DNA plasmid of *V. parahaemolyticus* AHPND strain using GeneQuant®

Ulangan Repeat	Konsentrasi plasmid DNA DNA plasmid concentration (ng μL^{-1})
1	33.7
2	34.9
3	32.8
4	33.3
5	33.4
6	32.9
\bar{x}	33.5
STD	0.761577311

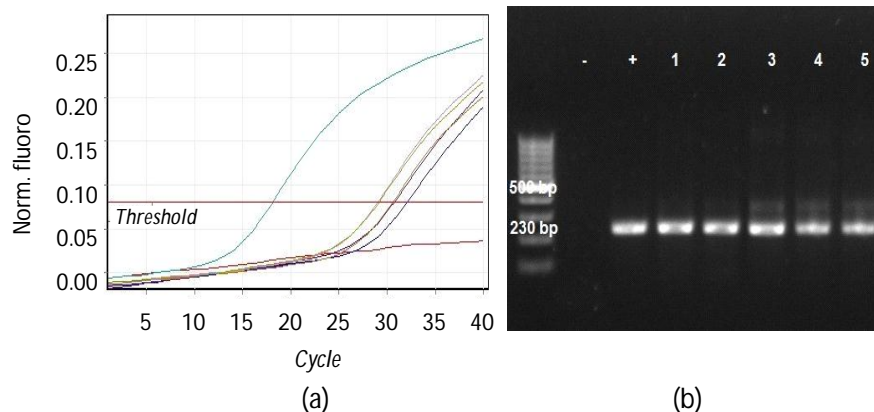


Keterangan: Kontrol positif (1), kontrol negatif (2), spesimen jaringan hepatopankreas dan saluran pencernaan (3-11) udang vaname yang berasal dari tambak udang Pamanukan, Jawa Barat

Note: Positive control (1), negative control (2), hepatopancreas tissue and digestive tract (3-11) of whiteleg shrimps originating from Pamanukan shrimp ponds, West Java

Gambar 1. Hasil qPCR primer *PirA* (a) dan PCR konvensional primer AP4 (b) pada spesimen jaringan udang vaname sehat.

Figure 1. Results of qPCR primer *PirA* testing (a) and conventional PCR primer AP4 (b) testing on healthy *vannamei* shrimp tissues.



Keterangan: Kontrol negatif (-), kontrol positif (+), spesimen jaringan (1-5) udang vaname tambak udang Pamanukan, yang di-spike plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND

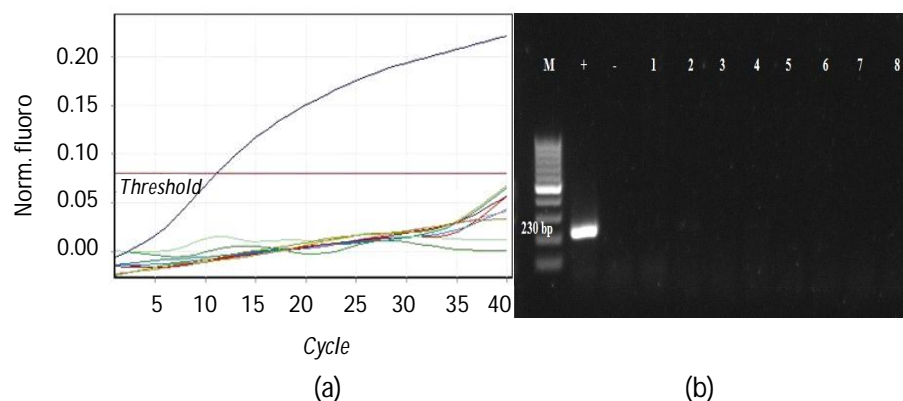
Note: Negative control (-), positive control (+), whiteleg shrimp tissues (1-5) from Pamanukan shrimp ponds spiked with plasmid DNA of *V. parahaemolyticus* AHPND strain

Gambar 2. Hasil test qPCR primer *PirA* (a) dan PCR konvensional primer AP4 (b) pada spesimen jaringan udang yang di-spike plasmid DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND.

Figure 2. Results of qPCR primer *PirA* testing (a) and conventional PCR primer AP4 (b) testing on shrimp tissues spiked with plasmid DNA of *V. parahaemolyticus* AHPND strain.

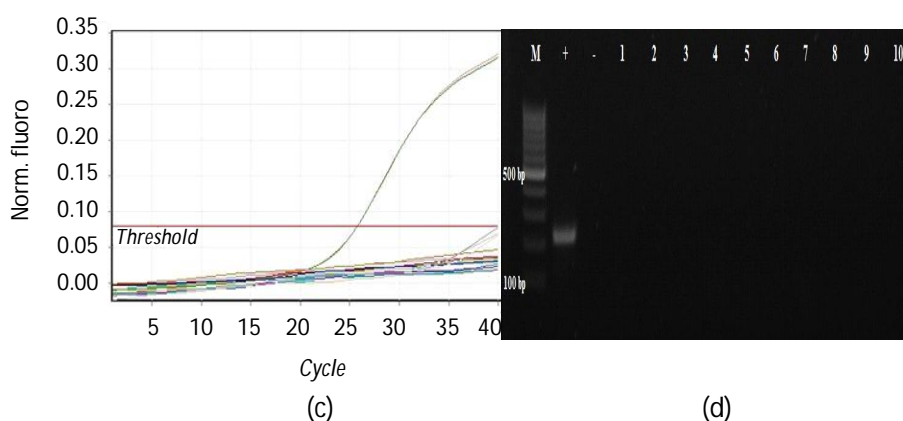
rendah dibandingkan dengan PCR konvensional primer AP4. Sensitivitas qPCR mendeteksi gen penyandi toksin *PirA* sesuai dengan Bustin *et al.* (2009); Kralik & Ricchi (2017) yang menyatakan nilai LoD dengan metode qPCR dapat mendeteksi hingga 10 kopi μL^{-1} DNA, namun beberapa faktor yang dapat memengaruhi dalam penentuan LoD di antaranya jumlah ulangan pengujian, persiapan asam nukleat, dan mesin qPCR.

Kurva standar qPCR primer *VpPirA* memperoleh nilai Ct terkecil pada pengenceran 10^1 kopi μL^{-1} sebesar 36, demikian pula dengan hasil pengukuran limit deteksi (LoD) diperoleh nilai Ct terkecil pada pengenceran yang sama sebesar 36. Mengacu pada pedoman penentuan nilai *cut off*, maka nilai *cut off* untuk deteksi gen penyandi toksin *PirA* dengan metode *real time* PCR adalah 39. Mengacu pada OIE



Keterangan: Kontrol positif (+), kontrol negatif (-), isolat *V. parahaemolyticus* non AHPND (1-2), isolat *V. alginolyticus* (3-4), isolat *V. vulnificus* (5-6), isolat *V. harveyi* (7-8)

Note: Positive control (+), negative control (-), non-AHPND *V. parahaemolyticus* isolate (1-2), *V. alginolyticus* isolate (3-4), *V. vulnificus* isolate (5-6), *V. harveyi* isolate (7-8)



Keterangan: Kontrol positif (+), kontrol negatif(-), fragmen DNA WSSV (1-2), fragmen DNA IHNV (3-4), fragmen DNA IMNV (5-6), fragmen DNA EHP (7-8), fragmen DNA SBV (9-10)

Note: Positive control (+), negative control (-), WSSV DNA fragments (1-2), IHNV DNA fragments (3-4), IMNV DNA fragments (5-6), EHP DNA fragments (7-8), SBV DNA fragments (9-10)

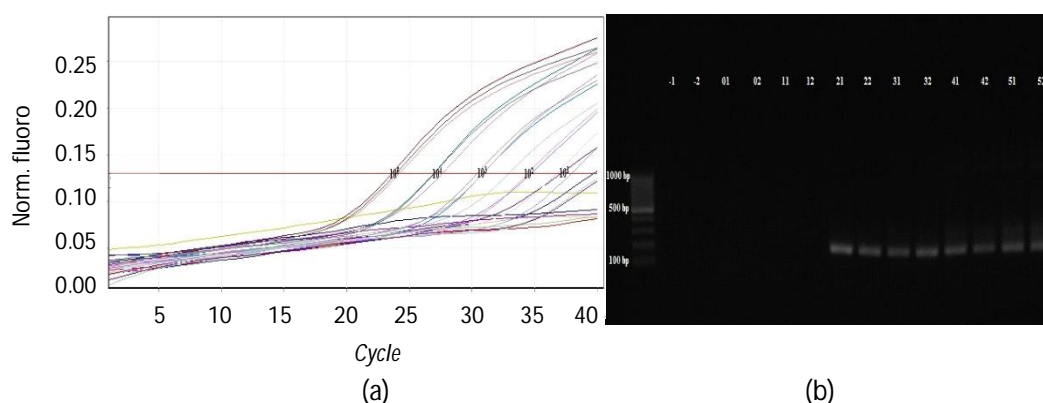
Gambar 3. Pengujian metode: qPCR primer *PirA* (a) dan PCR konvensional primer AP4 pada beberapa spesies *Vibrio* spp. (b), qPCR primer *PirA* (c) dan PCR konvensional primer AP4 (d); pada beberapa patogen selain bakteri pada udang vaname.

Figure 3. Test results of PCR methods: qPCR primer *PirA* (a) and conventional PCR primer AP4 on several *Vibrio* spp. species (b), qPCR primer *PirA* (c) and conventional PCR primer AP4 (d); on several non-bacterial pathogens of whiteleg shrimp.

(2014), maka untuk hasil pengujian dengan nilai Ct < 39 dinyatakan positif, sedangkan nilai Ct > 39 dinyatakan negatif, dan apabila nilai Ct = 39 maka pengujian harus diulang. Performa sensitivitas analitik metode qPCR mendeteksi gen penyandi toksin *PirA* telah memenuhi syarat keberterimaan, kemudian dilanjutkan dengan penilaian reipitabilitas dan reproduisibilitas.

Keterulangan (Repeatability) dan Ketertiruan (Reproducibility)

Metode *real time* PCR menunjukkan hasil reipitabilitas dan reproduisibilitas yang baik. CV untuk reipitabilitas berkisar 0,635 sampai dengan 1.718; sedangkan CV untuk reproduisibilitas berkisar 1.618 sampai dengan 1.977 (Tabel 3). Metode qPCR primer *VpPirA* menunjukkan hasil reipitabilitas dan



Keterangan: Kontrol negatif (-1-2), plasmid DNA VpAHPND 10^0 kopi μL^{-1} (01-02), plasmid DNA VpAHPND 10^1 kopi μL^{-1} (11-12), plasmid DNA VpAHPND 10^2 kopi μL^{-1} (21-22), plasmid DNA VpAHPND 10^3 kopi μL^{-1} (31-32), plasmid DNA VpAHPND 10^4 kopi μL^{-1} (41-42), plasmid DNA VpAHPND 10^5 kopi μL^{-1} (51-52)

Note: Negative control (-1-2), VpAHPND DNA plasmids 10^0 copies μL^{-1} (01-02), VpAHPND DNA plasmids 10^1 copies μL^{-1} (11-12), VpAHPND DNA plasmids 10^2 copies μL^{-1} (21-22), VpAHPND DNA plasmids 10^3 copies μL^{-1} (31-32), VpAHPND DNA plasmids 10^4 copies μL^{-1} (41-42), VpAHPND DNA plasmids 10^5 copies μL^{-1} (51-52)

Gambar 4. LoD metode qPCR primer *PirA* 6×10^1 kopi μL^{-1} (a) dan PCR konvensional primer AP4 6×10^2 kopi μL^{-1} (b).

Figure 4. LoD method qPCR primer *PirA* 6×10^1 copies μL^{-1} (a) and conventional PCR primer AP4 6×10^2 copies μL^{-1} (b).

reproduktibilitas yang baik, sesuai Ebentier *et al.* (2013) yang menyatakan nilai maksimum persentase koefisien varian (CV%) untuk reprodutabilitas (*intra assay*) adalah 5%, sedangkan nilai maksimum CV% untuk reproduktibilitas (*inter assay*) adalah 10%. Nilai CV *inter assay* pada metode qPCR primer *VpPirA* lebih tinggi dari *intra assay*, dikarenakan faktor analisis yang berbeda-beda akan berpengaruh terhadap hasil pengujian. Seluruh performa analitisal metode qPCR primer *VpPirA* telah memenuhi syarat keberterimaan, sehingga dilakukan uji lapang untuk menilai kelayakan metode qPCR terhadap sampel uji udang vaname.

Uji Lapang

Hasil deteksi gen penyandi toksin *PirA* terhadap 69 sampel dengan metode qPCR diperoleh perkiraan sensitivitas diagnostik (DSe) adalah 100%, dan perkiraan spesifisitas diagnostik (DSp) adalah 98,46%. Penilaian hasil uji lapang berupa perhitungan sensitivitas diagnostik (DSe) dan spesifisitas diagnostik (DSp) menunjukkan performa diagnostik yang sangat baik di atas 95%, sehingga metode *real time* PCR primer *VpPirA* sangat sensitif dan spesifik dalam mendeteksi gen penyandi toksin *PirA* pada udang vaname (OIE, 2014; Bustin *et al.*, 2009).

Tabel 3. Nilai persen koefisien varian (CV%) pengujian reprodutabilitas (*intra assay*) dan reproduktibilitas (*inter assay*) dengan qPCR primer *PirA*

Table 3. Percentage of coefficient variance (CV%) repeatability testing (*intra-assay*) and reproducibility testing (*inter-assay*) using qPCR primer *PirA*

Konsentrasi DNA DNA concentration	Variabilitas <i>intra assay</i> Intra assay variability	Variabilitas <i>inter assay</i> Inter assay variability
10^6 kopi μL^{-1} (10^6 copy μL^{-1})	CV% = 1.064	CV% = 1.977
10^4 kopi μL^{-1} (10^4 copy μL^{-1})	CV% = 0.635	CV% = 1.618
10^3 kopi μL^{-1} (10^3 copy μL^{-1})	CV% = 1.718	CV% = 1.744

Tabel 4. Hasil sampel uji lapang mendeteksi gen penyandi toksin *PirA* dengan metode qPCR
Table 4. Results of field-test samples for detecting *PirA* toxin encoding genes using qPCR method

Deteksi gen penyandi toksin <i>PirA</i> metode qPCR pasangan primer VpPirAF/R <i>Detection of PirA toxin encoding gene qPCR method in primary pair VpPirAF/R</i>	Nilai benar <i>True value</i>	
	Positif <i>Positive</i> (4)	Negatif <i>Negative</i> (65)
Positif (<i>Positive</i>)	4	1
Negatif (<i>Negative</i>)	0	64
Total	4	65

Hasil uji lapang juga menyatakan bahwa tambak-tambak tempat pengambilan sampel udang vaname tidak terdeteksi adanya *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND.

KESIMPULAN

Metode *real time* qPCR dengan menggunakan spesifik primer VpPirA telah divalidasi dan dapat digunakan sebagai metode uji dalam mendeteksi keberadaan gen penyandi toksin *PirA* pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Hasil deteksi *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND pada sampel udang vaname dari sampel udang tambak tidak terinfeksi Vp AHPND.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan kepada PUSDIK KP yang telah mendanai penelitian ini dan kepada Balai Uji Standar KIPM yang telah memfasilitasi sebagai tempat penelitian ini dilaksanakan.

DAFTAR ACUAN

- Banu, H. & Prasad, K.P. (2017). Role of plasmids in microbiology. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 8(1), 1-8.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, A., Hellemans, J., Hugget, J., Kubista, M., Mueller, R.,, & Wittwer, C.T. (2009). The MIQE minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- Caraguel, C.G.B., Stryhn, H., Gagne, N., Dohoo, I.R., & Hammell, K.L. (2011). Selection of a cut off value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches. *Journal of Veterinary Diagn Invest*, 23, 2-15.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S.,

Mavichak, R.,, & Flegel, T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158-162.

Ebentier, D.L., Hanley, K.T., Cao, Y., Badgley, B.D., Boehm, A.B., Ervin, J.S., Goodwin, K.D.,, & Sadowsky, M.J. (2013). Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of qPCR-based microbial source tracking methods. *Science Direct*, 47, 6839-6848.

Flegel, T.W. & Lo, C.F. (2013). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pasific*. Thailand.

Han, J.E., Kathy, F.J.T., Carlos, R.P., Brenda L.W., & Lightner, D.V. (2015). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 442, 12-15.

Kralik, P. & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-8.

OIE. (2014). Validation guidelines: Development and optimisation of nucleic acid detection assays. *Validation Guideline*, 3.6.3. OIE Publisher.

OIE. (2018). Manual of diagnostic test for aquatic animals: Acute hepatopancreatic necrosis disease. Chapter 2.2.1. OIE Publisher.

OIE. (2018). Principle and methods of validation of diagnostic assays for infectious disease. Chapter 1.1.1. OIE Publisher.

Scholtens, I.M.J., Kok, E.J., Hougs, L., Molenaar, B., Thissen, J.T.N.M., & Voet, H.V.D. (2010). Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 2213-2227.

- Shrivastava, A. & Gupta, V.B. (2015). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21-25.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T., Mavichak, R., & Proespraiwong, P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T.D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B.,, & Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Plos One*, 10(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0126987.
- Tran, L., Linda, N., Rita, M.R., Leone, L.M., Carlos, R.P., Kevin, F., & Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45-55.
- Walters, S.S. (2012). Real-time PCR in clinical diagnostic settings. *Medical Microbiology & Diagnosis*, 1(3). DOI: 10.4172/2161-0703.1000e106.